

④ Int. Cl.⁴

G 01 N 33/531
C 12 N 15/00

識別記号

庁内整理番号

Z-7906-2G
8412-4B

④ 公開 昭和63年(1988)5月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

④ 発明の名称 DNAの分子重量測定用標準マーカー

④ 特 願 昭61-148891

④ 出 願 昭61(1986)6月25日

④ 発 明 者 石 和 浩 美 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内

④ 発 明 者 柴 原 春 恵 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内

④ 出 願 人 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号

④ 代 理 人 弁理士 尾崎 光三

Doc. Ref. AL1
Appl. No. 08/892,884

明 細 書

標準マーカー。

1. 発明の名称

DNAの分子重量測定用標準マーカー

2. 特許請求の範囲

(1) プラスミドpHT300PLEに対して唯一の制限酵素切斷部位を有する制限酵素によって当該pHT300PLEを切斷して得られる4,870bpのDNA断片と、当該pHT300PLEを制限酵素EcoIによって切斷して得られる2,810bp、1,300bp、850bp、400bp、207bp及び80bpの6種類のDNA断片と、当該pHT300PLE由来のプラスミドpHT300.2PLEを制限酵素EcoIによって切斷して得られる1,300、1,107、920、850、400、207及び80bpの7種類のDNA断片とを、混合して成るDNAの分子重量測定用標準マーカー。

(2) プラスミドpHT300PLEに対して唯一の制限酵素切斷部位を有する制限酵素が、EcoIである特許請求の範囲第1項記載DNAの分子重量測定用

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル電気泳動等によりDNAの分子重量を測定する場合に適用されるDNAの分子重量測定用標準マーカーに関するものであり、更に詳しくは、高分子量領域から低分子量領域に至る広い分子重量領域にわたって適度に分散分布した数個のバンドをゲル上に明確に形成し得るDNAの分子重量測定用標準マーカーに関するものである。

<従来の技術及びその問題点>

従来、アガロースゲル電気泳動、アクリルアミドゲル電気泳動等に代表されるゲル電気泳動により、DNAの分子重量を測定する場合にスタンダード(参照用標準)として使用される分子重量測定用標準マーカー(以下、分子重量マーカーという)が、種々、開発されているが、実際には、DNAの分子

0452

用可能な分子量マーカーは比較的少なく、一般に、低分子領域で優れた分散分布特性を示す低分子マーカーと、高分子領域で同様の特性を示す高分子マーカー等を、適宜、選択し、利用目的に応じて、各々組み合わせて使用することが一般的な使用方法となっている。

現在、広く普及している分子量マーカーとして、例えば、 ϕ X174RF を制限酵素 Eco III で切断して作製されたものや、 λ ファージ DNA を制限酵素 Eco III で切断して作製されたもの等があるが、前者は、低分子領域において優れた分散分布特性を示すが、アガロースゲル電気泳動に用いると、数泳バンドが検出されていて分別が不明瞭となる傾向があり、また、後者は、2 kb 以上の高分子領域で有効であるが、低分子領域における分子量マーカーとしては不適当である。

このように、使用する分子量領域に応じて、使用可能な分子量マーカーが限られているために、實際に、適当な分子量マーカーを選択し、各々、

場合が多く、更に、 ϕ X174RF のような低分子マーカーの場合、より広い分子量領域にわたって適用可能な広域分子量マーカーがあれば、その實用価値は大きなものである。その上、従来の多くの分子量マーカーは、その製造工程において高度の技術と設備をテラユニットが必要とされることから、生産コストが極めて高く、コスト面からも、より簡便性の高い製造技術を開発することが強く要請されている状況にあった。

分子量マーカーについてのこのような問題点を検討すると共に、本発明者らは、より広い分子量領域において適用可能な優れた分子量マーカーを開発すべく鋭意研究開発を積み重ねた結果、プラスミド pHT300PLE 及び菌株 pHT300PLE 由来の pHT300.2PLE 等、各々特定の制限酵素により切断して得られる DNA 断片の混合物が、このような分子量マーカーとして好適であることを見い出して、本発明を完成するに至った。

<問題点を解決するための手段>

すなわち、本発明は、アガロースゲル電気泳動等に適用可能で、より広い分子量領域において使用することのできる DNA の分子量測定用標準マーカーを提供することを目的とするものである。

そして、このような目的を達成するために採用される本発明の構成は、①プラスミド pHT300PLE に対して唯一の制限酵素切断部位を有する制限酵素によって菌株 pHT300PLE を切断して作製される 6,070bp の DNA 断片と、②菌株 pHT300PLE を制限酵素 Eco III によって切断して作製される 2,010bp、1,300bp、850bp、400bp、207bp 及び 80bp の 6 種類の DNA 断片と、③菌株 pHT300PLE 由来のプラスミド pHT300.2PLE を Eco III によって切断して作製される 1,300、1,107、920、650、400、207 及び 80bp の 7 種類の DNA 断片とを混合して成るものである。

ここで、前記③記載のプラスミド pHT300PLE に対して唯一の制限酵素切断部位を有する制限酵素としては、例えば、 Eco III が好適に使用されう

る。

由発材料として使用するプラスミド pHT300PLE は、公知・入手可能（農工研発第 744 号として通商産業省工務技術院微生物工務技術研究所に寄託）のものであり、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pACYC177 と、ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*) 由来のプラスミド pAR α 1 を組み立てて作製された複合プラスミド pHT400 から公知手段により作製される (Jpn. J. Genet. 12, 235-243 (1986) 参照)。

また、前記③記載のプラスミド pHT300.2PLE は、以下の工程により前記 pHT300PLE から作製される。すなわち、プラスミド pHT300PLE を制限酵素 Eco I 及び Eco RV により切断して得られる 2 種類の DNA 断片のうちの高分子量の断片と、前記複合プラスミド pHT400 断片から公知手段により作製された pHT340 を Eco I 及び Eco RV により切断して得られる 2 種類の DNA 断片のうちの高分子量の断片とを連結して pHT300.2PLE を作製する工程を経て、次いで、菌株 pHT300.2PLE の Eco I 切断部位に、

なお、前記pHY300.7PLEの作成は、従来、公知の手段により実施される（Jpn. J. Genet. 11, 485-490(1985) 参照）。そして、このpHY300.7PLEは、制限酵素Eco Iによる切斷部位が、pHY300由来のDNA断片中（これをEco I¹とする）と、pHY300PLE由来のDNA断片中（これをEco I²とする）の2ヶ所に存在するが、このうち、Eco I¹切斷部位は、Eco Iリンカーが2個挿入されたものが、pHY300.2PLE (4,007bp)である。

このpHY300.2PLEは、挿入された2個のEco Iリンカーにより、新たにEco I切斷部位及びEco II切斷部位が形成されると共に、Eco I²切斷部位を消失するが、テトラサイクリン耐性遺伝子中のEco Iは残存しているので、前記pHY300.2PLEによる形質転換体は、テトラサイクリン耐性を示す。

pHY300.2PLEの製作工程及びpHY300.2PLEの制限酵素地図を、各々、第2図及び第3図に示す。

本発明の分子量マーカーの構成要素であるpHY300PLE及びpHY300.2PLEの各切斷A~Iと、組換え分子量との関係を表1に示す。

表 1
(単位:bp)

アライメント 切斷部	pHY300PLE	pHY300PLE	pHY300.2PLE
	Eco I	Eco II	Eco I
A	4,879	—	—
B	—	2,016	—
C	—	1,360	1,360
D	—	—	1,107
E	—	—	928
F	—	656	656
G	—	489	489
H	—	287	287
I	—	80	80

され、これにより得られたDNA断片を、適宜の割合で混合することにより、目的の分子量マーカーが製作される。

そして、例えば、前記①、②及び③記載のDNA断片を、1:2:10の割合で混合して作成した分子量マーカーを1%アガロースゲル電気泳動により泳動テストした結果（第4図A、レーン2参照）から確認されるように、本発明の分子量マーカーは、1000bpの高分子量領域から、80bpの低分子量領域にわたって、適度に分散分布した9本の明瞭なバンドの形成が可能であるという従来製品にみられない顕著な効果を有することが判明した。

また、DNA断片作成のための出発材料としてのpHY300PLE及びpHY300.2PLEは、大腸菌（E. coli）によるマルチコピーベクターとして、簡単に処理により、きわめて高効率の生産が可能であることから、生産コストの面においてもそのコスト低減効果は絶大である。

<実施例>

以下に、実施例を記載して、更に、本発明について具体的に説明するが、本発明は、いうまでもなく前記実施例の範囲に限定されるものではない。

(1) pHY300.2PLEのEco I切斷部位の創設及びEco Iリンカーの挿入（pHY300.2PLEの作成）

53μlのpHY300.7PLE DNA (100 μg / μl) (J. Genet. 10, 485-490 (1985)参照)に、5.7 μlの10倍濃度緩衝液(1M Tris-HCl (pH 7.8), 70mM MgCl₂, 70mM β-メルカプトエタノール, 500mM NaCl)を加えた後、Eco I (3.8 u / μl)を2 μl添加し、37℃、30分間反応させた。70℃で5分間加熱することにより反応を停止させた後、1%低融点アガロースゲル(8 x 12cm, 1 μg / μlエチジウムブロマイド含有)電気泳動を行い、Eco Iにより1ヶ所が切斷された分子量的約 3.0 kbのバンドを切り出した。

pH 8.0))を加え、55℃の湯槽中で溶かしした後、室温までさまし、等量のフェノールを加えてよく混ざらした。次に、室温で 15000rpm、3 分間の遠心分離処理を施した後、DNA を含む水層を採取し、再び等量のフェノールを加え、前記処理を繰返し、DNA を含む水層を採取した。続いて、これに 200 μ l の緩衝液 (50mM Tris, 10mM EDTA, 100mM NaCl (pH 8.0))を加え、更に全量の 2 倍量の -20℃ の冷エタノールを加え、-20℃、30 分間冷却した。これに 0℃、15000rpm、5 分間の遠心分離を施し、DNA 沈殿物を再び -20℃ エタノールで洗淨した後、再度、0℃、15000rpm、2 分間の遠心分離を施し、上澄のエタノールを除く。沈殿物中に残っているエタノールを完全に蒸発させた。ここで、得られた DNA に、5 μ l の緩衝液を加えて DNA を溶解し、10 倍濃度の T4 DNA ポリメラーゼ緩衝液 (570mM Tris-HCl (pH 8.0), 67 mM MgCl₂, 70mM β -メルカプトエタノール)

5 μ l の T4 DNA ポリメラーゼを 0.5 μ l 加え、37℃で 15 分間、反応させた。更に、200 μ l の 50mM Tris-HCl (pH 8.0) - 10mM EDTA - 10 mM NaCl を加えた後、フェノールを加えて溶解を失敗させた。次いで、前述の冷エタノール沈殿液より DNA を回収した。

ここで、得られた DNA に 2.0 μ l の緩衝液を加えて溶解させ、 λ リンカー [4 (pGGTCGAGG) / 空細胞 (株) 製, 0.01-0.05 μ l] を 1 μ l 加え、3 μ l の 10mM ATP, 3 μ l の 100mM グチオスレイトール, 3 μ l の 500mM Tris-HCl (pH 7.0) - 50mM MgCl₂ を加え、更に、3 u/ μ l の T4 DNA リガーゼを 1 μ l 加えた。15℃で 3 時間の反応を行かせた後、120 μ l の緩衝液を加え全量を 150 μ l とした。

(2) 大腸菌の形質転換

前記 (1) 記載の処理で得られたプラスミド DNA 150 μ l (約 0.5 μ g) に、150 μ l の大腸菌

(λ λ 12 C000 株, Jpn. J. Genet. 11, 23 5-243 (1985) 参照) のコンピタント細胞を加え、0℃、10 分間放置した後、0.2 μ l の L-ブロスを加えて、37℃、1 時間培養した。次いで、この培養液を L-ブロスに 1.5 倍の希釈と 20 μ g / μ l のテトラサイクリンを添加して成る希釈培養地の表面に塗布して、37℃で一晩培養した。この希釈培養地上にコロニーを形成した 12 株の形質転換体について、個々のプラスミドの大きさを調べた。

(3) プラスミドの抽出と分子量の測定及び λ

a. λ λ 12 C000 株の形質転換体の抽出

pBT200.7PLE の λ λ 12 形質転換体は、テトラサイクリン感受性遺伝子 λ λ 12 中に位置していることから、前記 (1) 記載の処理で λ λ 12 形質転換体を増殖すると、テトラサイクリン感受性になることから、テトラサイクリンを添加した L-ブロス希釈培養地上では、形質転換体の生育は見られない。そこで、 λ λ 12 形質転換体が感染していてテトラサイクリン感受性を示す形質転換体からプラスミドを抽出し、新たに λ λ 12 形質転換体が形成されたプラスミドを

選別した。

すなわち、前記 (2) 記載の処理で得られた形質転換体を 5 μ l の L-ブロスで一晩培養後、遠心分離処理により菌液を 2 μ l の 20mM Tris - 10mM EDTA (pH 8.0) に懸濁し、0.2 μ l の 0.2 μ g / μ l リゾチーム - 0.05 μ g / μ l RNase を加えて室温で 5 分間の反応を行った後、0.2 μ l の 0.2 μ g / μ l 溶菌液を加え室温で 2 分間反応させ、0℃、10 分間放置後、この菌液に 20,000rpm、0℃、10 分間の遠心分離処理を施した。分離された上清に緩衝液で飽和したフェノールを等量加え、よく混ざらした。更に、これを 15,000rpm、室温、3 分間の遠心分離処理を施し、DNA を含む水層を採取し、15 μ l ずつ 0.8 μ g / μ l アガロースゲル電気泳動にかけて、その分子量を測定した。その結果、12 株の形質転換体の保有するプラスミドは、全ての約 3.0kb であった。

次に、この 12 株の形質転換体の保有するプラスミドのうち、目的どおり λ λ 12 形質転換体が形成されたものをさがすために、後述に使用された通りの、DNA を含む水層から冷エタノール法により DNA

0.1m EDTA(pH7.4) を加えて溶解した。

このプラスミド DNA 10 μ l に、2 倍濃度緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 7.0), 10mM NaCl, 10mM β -メルカプトエタノール, 100mM NaCl) を 10 μ l 加えた後、更に、12u/ μ l の I を 1 μ l 添加し、これを 37℃ で 90 分間反応させた。そして、70℃、5 分間の加熱処理により、この反応を停止させ、全量を 0.8 % アガロースゲルで分離させた。その結果、I で切斷されたプラスミド DNA が 1 種類精製された。

続いて、この採取されたプラスミド DNA 10 μ l に 2 倍濃度緩衝液 (20m Tris-HCl (pH7.6), 10m MgCl_2 , 10m β -メルカプトエタノール, 100m NaCl) を 10 μ l 加え、そこに 3.5 μ l/ml の H_2O_2 と 12 μ l/ml の $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ を、各々 1 μ l 単独又は混合液加し、これを 37 $^\circ\text{C}$ 、60 分間反応された後、70 $^\circ\text{C}$ 、5 分間の加熱処理により、この反応を停止させ、全量を 0.8 %アガロースゲルで電気泳動させた。その結果、目的どおり、 H_2O_2 処理

されたものである（第2圖、第3圖参照）。

(4) 2HY200PLE 及び 2HY200.2PLE の各膜片の
割合による DNA 分子量マーカーの作製

前記(3)記載の処理で得られたpET300.2PLE
を常法によりE1E 菌で切開して得られた7個の切
断片(第4図B、レーン1)と、pET300PLE (Ja
n.J.Gene.19, 235-243(1985) 参照)を常法によ
り、E1E 菌及び E1E6 菌で各々切開して得られた
8個の切断片(第4図B、レーン2)及び1個の
切断片(第4図B、レーン3)とを、各々、10:2
:1の混合割合で混合して、目的の分子量マーカ
ーを得た。

アイソスゲル(1%)電気泳動の泳動バンド(第4図A, レーン2のA~I)から明らかのように、本発明の分子量マーカーは、約5,000bpの高分子重量領域から100bpの低分子重量領域にわたる広分子重量領域に連続に分散分布したDNA断片による明確なバンドを形成し得る優れた特性を有するものであることが確認された。

比較対象として、従来の分子量マーカーの分子

。そして、これを pHY300.2PLK と命名した。

を、前述の処理で、 I_{112} 切離部位に I_{112} リンカーを挿入する際、 I_{112} リンカーが単一で挿入される場合と、複製体連鎖して挿入される場合とが考えられる。仮りに、 I_{112} リンカーが2個挿入されていると、連鎖した2個の I_{112} リンカーの間に、新しい I_{112} 切離部位が形成されることになる。

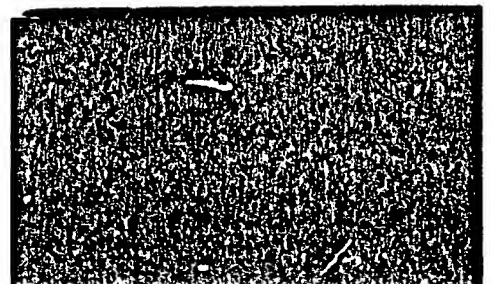
pHT300.7PLE の SalI 切断部位は、全部で8個あるが、pHT300.2PLE のDNA を SalI で切断して得られたDNA 断片に関しては、その個数及び各々の分子量をアガロースゲル電気泳動により測定した結果、7個の断片が確認された。このことは、新たに形成された SalI 切断部位に SalI 切断部位が形成されていることを意味するものである。すなわち、pHT300.2PLE は、pHT300.7PLE の SalI 部位に2個の SalI リンカーが挿入されたものであり、その結果、新たに SalI 切断部位が形成

1742F の LiCl 固相片及び A ファージ BFA の LiCl 固相片のアオロースゲル(1%)電気泳動による泳動バンドを参照してみると、 ϕE 1742F 分子量マーカーは、低分子重量域で泳れているものの、アオロースゲル(1%)電気泳動では、バンド ϕ 、 ψ 、 θ 、 ι 等が横断しているので、その分別が不明確且つ困難であり(図4図A、レーン1、 $\phi \sim \iota$)、また、 A ファージ BFA 分子量マーカーは、高分子重量域にて限定的に有効なものである(図4図A、レーン3)ことから、本発明の分子量マーカーは、その分散分布領域の広さという点で優れたものであることが明らかである。

更に、本発明の分子量マーカーの作製材料である pHT300PLE 及び pHT300.2PLE は、大腸菌 (E. coli K12 C800 株) を宿主として大量生産が容易であることから、生産コストの面でも極めて優れた特長を有することが確認された。

4. 関数の簡単な説明

第1圖は、プラスミドpHY300PLEの制限酵素地図



を調べる。

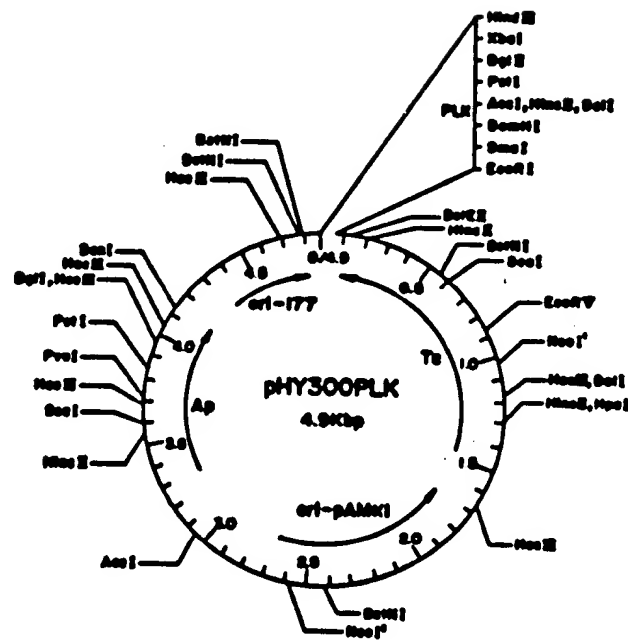
第3回は、プラスミドpHY300.2PLKの制限酵素地図を調べる。

第4回は、アガロースゲル(1%)電気泳動による泳動結果としてのバンドを示す写真であり、同図のAにおいて、レーン1は、φX174RFの λ II消化断片(6~8)を、レーン2は、本発明の分子重量マーカー(A~I)を、レーン3は、入ファージDNAの λ II消化断片を、そして、同図Bにおいて、レーン1は、pHY300.2PLKの λ II消化断片を、レーン2は、pHY300PLKの λ II消化断片を、レーン3は、pHY300PLKの λ II消化断片を、各々調べる。

特許出願人 株式会社 ヤクルト本社

代理人 弁護士 尾崎元三

第1図



「よる数値結果としての……写真であり。」を
「よる数値結果としてのバンドを示す電子顕微鏡の
写真であり。」に修正する。

特許庁長官 小川 邦 夫 閣

1. 事件の表示

昭和61年 特許願 第148891号

2. 発明の名称

DNAの分子量測定用標準マーカー

3. 修正をする者

事件との関係 特許出願人

居 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号

(000) 株式会社 ヤマト本社

名 称 取締役社長 松 岡 尚 巳

4. 代理人

住 所 東京都渋谷区道玄坂1丁目20番2号

オリエンタル通文館502号

氏 名 弁護士 (0149) 尾 崎 元

5. 修正命令の日付 昭和62年10月7日

(昭和62年10月27日付発送)

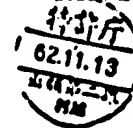
6. 修正により増加する発明の数 0

7. 修正の対象

明細書の「図面の簡単な説明」の欄
及び図面(第4図)

8. 修正の内容

別紙の通り



8. 修正の内容

(1) 明細書の「図面の簡単な説明」の欄の記載
を以下のように修正する。

(1) 第19頁第6行～同第7行

「第4図は……写真であり。」を

「第4図は、アガロースゲル(1%)電気泳動
による数値結果としてのバンドを撮写した顕
微鏡であり。」に修正する。

0459